

## Sirtuins 家族维持基因组稳定性的研究进展

陈思齐<sup>1</sup>, 胡 烨<sup>2</sup>, 谢 妮<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> 广州医科大学 广东广州

<sup>2</sup> 南华大学 湖南衡阳

<sup>3</sup> 深圳市第二人民医院生物样本库 广东深圳

**【摘要】** 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 依赖的脱乙酰基酶 Sirtuins 家族, 广泛参与了细胞代谢、细胞周期及维持基因组稳态的调控。Sirtuins 家族成员通过不同方式参与了对基因组稳态的调控, 如: 防止 DNA 损伤并促进 DNA 修复、组蛋白和非组蛋白靶标的脱乙酰基化等。近年来随着研究的深入, 对 Sirtuins 家族在基因组稳定性调节中的作用有了更深的理解, 本文着重对 Sirtuins 家族在维持基因组稳态调节的最近进展进行回顾和总结。

**【关键词】** Sirtuins; 基因组稳定性; DNA 损伤; DNA 修复

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (81972003)

### The Current Progress of Sirtuins Family Maintain Genomic Stability

Chen Siqi<sup>1</sup>, Hu Ye<sup>2</sup>, Xi Ni<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

<sup>2</sup>University of South China, Hengyang Hunan

<sup>3</sup>BioBank, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen Guangdong

**【Abstract】** Human Sirtuins family is an nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) -dependent protein deacetylases, which deeply involved in regulation of cellular metabolism, cell cycle progression and maintenance of genomic stability. Members of Sirtuins are involved in the regulation of genomic homeostasis through different pathways, such as prevent DNA damage and promote DNA damage repair, deacetylate both histone and non-histone targets. With further research, the role of sirtuins family in the regulation of genome stability has been further understood. This paper reviews and summarizes the recent progress of sirtuins family in the regulation of genome stability.

**【Keywords】** Sirtuins; Genomic Stability; DNA Damage; DNA Repair

基因组 DNA 不断受到复制压力、内源性代谢物和环境压力因素的威胁, 例如氧化应激、紫外线和电离辐射等, 这些都将引起 DNA 的损伤, 导致细胞的衰老、凋亡或肿瘤发生。维持基因组稳定性对于维护生物体中遗传物质的完整遗传至关重要。DNA 损伤应答是维持基因组稳定的重要调控机制, 通过整合多种细胞生物调控过程, 包括损伤位点识别、损伤信号激活和传导、DNA 断裂修复、染色质结构重塑、细胞周期检验点激活、转录暂停等, 最终实现 DNA 损伤修复或在 DNA 严重损伤无法修复时启

动细胞凋亡程序。

Sirtuins 家族共有 7 个成员, 是一类以脱乙酰基酶活性为主的蛋白家族, 属于 III 类组蛋白去乙酰化酶 (HDAC), 可通过对组蛋白的乙酰化程度的调节参与染色质构型的重建, 组蛋白的去乙酰化使核小体周围正电荷增加, 增强了组蛋白与带负电荷的 DNA 磷酸基的相互作用, 使染色体处于紧密状态, 进而可在表观遗传学水平维持基因组稳定性。且 Sirtuins 蛋白的脱乙酰基酶活性依赖辅酶因子 NAD<sup>+</sup> 的作用, NAD<sup>+</sup> 是连接三羧酸循环和呼吸链的重要

\*通讯作者: 谢妮

递氢体, 这一特性表明该蛋白家族可作为氧化还原和能量代谢的重要传感器来协调细胞生理功能, 并在代谢/能量压力和遗传毒性压力下调节基因组稳态<sup>[1]</sup>。而随着对 Sirtuins 蛋白家族的进一步研究, 近年来也确定了 Sirtuins 家族的许多非组蛋白靶标, 涉及 DNA 损伤应答中多个方面。综上可见人 Sirtuins 蛋白家族在维护基因组稳定性中是必不可少的, 目前已知可参与基因组稳定性的成员包括 SIRT1、2、3、4、6、7。由于其不同的酶活性及细胞学定位发挥着不同的生物学功能。本文将综合 Sirtuins 家族在维持基因组稳态中的不同作用进行总结。

### 1 Sirtuins 参与 DNA 双链损伤修复

DNA 的损伤呈碱基变异、二聚体形成、加合物形成、DNA 单链断裂和 DNA 双链断裂 (DSBs, double-strand breaks) 等多种类型, 其中 DSBs 是 DNA 损伤中最严重的, 对基因组稳定性及细胞存活影响最大的损伤类型。近年来研究发现 Sirtuins 蛋白在 DSBs 的直接修复中发挥着重要作用, 可防止 DNA 损伤并在 DNA 损伤修复在许多不同阶段发挥作用。

在人类胚胎干细胞 (hESCs) 中, 使用 SIRT1 抑制剂会诱导 hESCs 的凋亡, 对抑制处理早期 (Tenovin-6 处理 2 小时) 的细胞进行蛋白质组学分析发现, hESCs 中的 DNA 修复蛋白 (例如 MSH2, MSH6 和 APEX1) 显著降低, DNA 损伤位点增加<sup>[2]</sup>。在神经干细胞 (NSCs) 中敲低 SIRT1 改变了 NSCs 的在 DNA 损伤时的选择性剪切, 从而影响许多细胞程序, 其中 DNA 损伤修复过程和细胞周期过程的改变较显著, 在 SIRT1 敲除小鼠的 NSCs 中可观察到 DNA 损伤标记物  $\gamma$ H2AX 明显增加<sup>[3]</sup>。既往研究表明 SIRT1 可去乙酰化 DNA 修复因子如 KU70、奈梅亨断裂综合症蛋白 (NBS1) 和色干色素补充组 A (XPA) 等, 增强其 DNA 修复能力<sup>[4]</sup>。SIRT1 也可去乙酰化 P53 蛋白 C 端赖氨酸 382 残基, 并通过辅助因子 NAD<sup>+</sup> 与 P53 的结合并使 P53 的 DNA 结合能力减弱, 共同作用降低 P53 介导的转录活性<sup>[5]</sup>, 抑制下游蛋白 (P21、PUMA 等) 的表达, 进而抑制 P53 依赖性细胞凋亡, 增强 DNA 修复机制。最近研究发现, SIRT1 还可通过影响 Werner 综合征蛋白 (WRN) 乙酰化/去乙酰化的水平调节其解旋酶和外切酶活性的激活, 调节 WRN 蛋白的 DNA 修复作用,

同时介导 WRN 蛋白在核质与核仁间的转运<sup>[6]</sup>, 敲除 SIRT1 会延迟 DNA 修复完成后 WRN 蛋白重新进入核仁。除了增加的 DNA 修复能力, SIRT1 也可参与 DSBs 修复途径的选择。DSBs 时细胞通过同源重组 (HR) 或非同源末端连接 (NHEJ) 进行修复, HR 的精确修复方式保障了 DNA 的同源性, NHEJ 虽然无法确保修复 DNA 链, 但其迅速的修复方式可避免因 DNA 断裂端的滞留而造成的 DNA 降解, 细胞通过调节这两种方式的平衡保护基因组的长期稳定。细胞中 KAP1 水平上调时阻碍了 DSBs 位点的 BRCA1 的募集, 可能负调节 HR 修复途径, SIRT1 通过使 KAP1 脱乙酰化, 稳定 KAP1 和 53BP1 之间的缔合, 使 DNA 损伤导致 53BP1 病灶的形成增加, 有助于 NHEJ 途径修复<sup>[7]</sup>。同时 SIRT1 在预防 DNA 断裂方面也发挥着重要作用。DNA 过度复制压力会导致复制叉停滞瓦解及 DNA 断裂, SIRT1, 尤其是 SIRT1 的苏氨酸 530 (T530) 的磷酸化形式以细胞周期特异性的方式与染色质结合, 并在复制起点处高度富集<sup>[8]</sup>, 可抑制休眠起源 (dormant origins) 的潜在复制起点的激活, 对缓解 DNA 复制压力起重要作用, SIRT1 的磷酸化也可促进复制叉的延伸, 敲低 SIRT1 的细胞中出现 DNA 链断裂的频率增加。

随着对 Sirtuins 家族其他成员的深入研究发现, SIRT2 和 SIRT3 也可参与电离辐射 IR 诱导的 DSBs 位点处同源修复途径的调节。同源修复蛋白 RAD52 的乙酰化有利于其在 DSBs 位点的有效募集和持续保留, DSBs 时 HATs (p300/CBP) 和 HDACs (SIRT2/SIRT3) 共同调节 RAD52 的乙酰化水平<sup>[9]</sup>, 进而调节细胞对修复途径的选择。SIRT2 还可通过在细胞周期蛋白依赖激酶 9 (CDK9) Lys-48 位点处去乙酰基, 增加 CDK9 的酶活性, 在复制应激时促进基因组从复制停滞中恢复<sup>[10]</sup>, 敲低 SIRT2 会导致基因组对复制压力敏感。

SIRT6 在 DNA 损伤应答的起始阶段发挥重要作用。SIRT6 对 DNA 链断裂端有高亲和力, 通过其核心结构域结合 ssDNA, 形成一个“隧道状”结构, 直接识别 DNA 断裂损伤<sup>[11]</sup>, 并触发 ATM 蛋白募集、H2AX 磷酸化以及同源重组和非同源末端连接途径的蛋白质募集, 激活双链断裂修复的下游信号传导。在 DNA 双链断裂时, H2AX 在 Ser139 位点处迅速磷酸化, 生成  $\gamma$ H2AX 灶, SIRT6/SNF2H 可协同调

节 H2AX 在损伤位点的快速稳定, 有助于  $\gamma$ H2AX 灶的形成以响应 DNA 损伤信号并促进 DSBs 稳定修复<sup>[12]</sup>。在 DSBs 位点, SIRT6 通过单 ADP-核糖基转移酶活性可以催化 PARP1 赖氨酸残基 521 位点, 从而激活 PARP1 活性并增强氧化应激下的 DSBs 修复<sup>[13]</sup>。SIRT6 也可与 DNA 双链断裂修复因子 DNA-PK (DNA 依赖性蛋白激酶) 形成大分子复合物, 通过稳定 DNA-PK 与染色质的结合影响 DSBs 修复的效率。SIRT6 和 CHD4 都是关键的染色质调节剂, 它们可以在 DNA 损伤时促进染色质重塑, 且在损伤处 CHD4 可与 H3K9me3 竞争结合并释放异染色质蛋白 1 (HP1), 促进染色质松弛以保障适当的同源重组。SIRT6 可与 CHD4 相互作用, SIRT6 将 CHD4 募集至 DSBs 位点, SIRT6 的 C 末端域与 CHD4 结合, 同时促进 H3K9 脱乙酰基作用, 这两点共同调节 CHD4 亚细胞定位, 以响应 DNA 损伤<sup>[14]</sup>。

近年来的深入研究发现 SIRT7 也具有保护基因组的功能, SIRT7 的脱乙酰基作用是 ATM 去磷酸化并失活所必须的, SIRT7 在 DNA 损伤应答后期募集至损伤处, 介导 ATM 的去乙酰化, 避免在 DNA 修复完成后持续的 ATM 激活所导致 DNA 修复和细胞存活受损<sup>[15]</sup>。SIRT7 也可去乙酰化 DEAD 盒 RNA 解旋酶 (DDX21), 使其解旋酶活性增强, 减少转录中 R 环的异常形成和持续存在, 防止转录延长所导致 DNA 损伤<sup>[16]</sup>。

## 2 Sirtuins 参与 DNA 损伤时组蛋白的调节

染色质的结构和动力学可调节基因组的转录和修复, 其调节由组蛋白尾部的乙酰化、甲基化和磷酸化等修饰决定。组蛋白去乙酰化可通过改变染色质的紧密度影响 DNA 损伤修复的敏感性, DNA 损伤修复需要组蛋白修饰和 ATP 依赖的重塑的染色质中进行。DNA 损伤位点的染色质结构变化有助于 DNA 损伤的信号传导, 增加修复蛋白进入断裂位点并与之结合, 抑制损伤位点的转录和修复完成后局部染色质环境的正常恢复。Sirtuins 家族可通过组蛋白内位点特异性赖氨酸残基的脱乙酰作用实现对 DNA 修复的调控。SIRT1, SIRT2, SIRT6 和 SIRT7 在该过程中发挥了重要作用。

SIRT1 可通过对组蛋白 H4K16AC 和 H3K9AC 的去乙酰化, 促进 H3K9 的三甲基化, 并在启动子处招募 H1, 催化 H1 蛋白 K26 位点去乙酰化, 共同

介导染色质紧密性增加, 导致异染色质的形成和在氧化应激条件下的基因沉默<sup>[17]</sup>。在乳腺癌 (ER+) 细胞系中 SIRT1 敲低也可使 DNA 损伤修复蛋白 BRCA1 基因启动子上的 H3K4AC 水平增高, 表明 SIRT1 可抑制 BRCA1 基因表达。

SIRT2 对 H4K16Ac 具有高度特异性, H4K16 的乙酰化/脱乙酰化涉及转录调控、DNA 修复和重组等, H4K16Ac 在体外可抑制染色质纤维的折叠, 促进染色质的高阶形成<sup>[18]</sup>。有丝分裂期间 SIRT2 通过 H4K16ac 去乙酰化, 调节 H4K20 的甲基化 (H4K20me1) 水平, 在有丝分裂和 DNA 修复信号传导的中起重要作用<sup>[18]</sup>, 试验中敲低 SIRT2 的动物表现出基因组不稳定和染色体畸变, 并易于发生肿瘤。

既往研究表明 SIRT6 可使损伤位点的 H3K56 脱乙酰基<sup>[9]</sup>, 防止 H3K56 过度乙酰化导致的 DNA 对 DNA 损伤剂的敏感性提高和基因组不稳定。近来研究发现, SIRT6 可通过对端粒处染色质组蛋白 H3 赖氨酸 9 (H3K9) 脱乙酰基, 维持端粒处 H3K9 的低乙酰化水平, 保证了 H3K9 与 WRN 蛋白 (蛋白质-沃纳综合症解旋酶) 的结合, 防止端粒功能异常导致染色体融合和基因组不稳定<sup>[19]</sup>。SIRT6 还可以通过去乙酰化 H3K18, 维持着丝粒周围的臂间染色质沉默, 防止有丝分裂错误和基因组不稳定<sup>[20]</sup>。

SIRT7 以 PARP1 依赖的方式被招募到 DSBs 处, 并催化损伤处 H3K122 的脱琥珀酰化, 从而促进染色质的浓缩和 DSBs 的修复, 敲低 SIRT7 时细胞对遗传毒性压力敏感<sup>[21]</sup>。SIRT7 和 KAT2A 可分别作为脱谷氨酰胺酶和谷氨酰胺转移酶, 调节 H4K91 的戊二酰化 (H4K91glu) 程度, H4K91glu 通过影响 (H2A / H2B) 和 (H3 / H4) 2 的相互作用阻止八倍体的形成, 破坏核小体的稳定性<sup>[22]</sup>, H4K91glu 的下调与响应 DNA 损伤时与染色质凝缩紧密相关。

## 3 Sirtuins 参与 DNA 损伤时非组蛋白调节

Sirtuins 蛋白还可通过非组蛋白的乙酰化水平调节参与表观遗传学的调节, 特别是在有丝分裂中作用, 与其他有丝分裂蛋白共同协调姐妹染色单体的正确分离, 保障有丝分裂时将重复的遗传物质平均分配到两个子细胞中, 维持基因组的稳定。

动粒相关蛋白 (HEC1) 的磷酸化作用会减弱 NDC80 复合物 (由 HEC1, NUF2, SPC24 和 SPC25

组成)与微管的附着,从而纠正异常连接。SIRT1 在 Lys-53 / Lys-59 位点结合并催化 HEC1 的脱乙酰基作用会导致 Aurora B 对 HEC1 的磷酸化作用减弱,从而稳定动粒-微管的连接<sup>[23]</sup>, HEC1 的磷酸化/去乙酰化作用共同调整有丝分裂中动态的动粒-微管相互作用,确保精确的有丝分裂过程,维持基因组稳定性。SIRT1 还可通过其去乙酰基作用参与中心体蛋白 polo 样激酶 2 (Plk2) 的泛素化调节,动态调节分裂细胞中心体的复制<sup>[24]</sup>。G1 早期,磷酸化的 SIRT1 对 Plk2 的亲和力增加,使 Plk2 去乙酰化并促进其降解。G1 晚期, SIRT1 磷酸化降低,对 Plk2 去乙酰化作用减弱, Plk2 蛋白快速积累,有利于启动中心粒复制。

促后期复合物/环小体 (APC / C) 复合物在有丝分裂中参与多种蛋白 (Aurora-A/B, cyclins-A/B 等) 的泛素化调节,复合物中的 CDH1 和 CDC20 亚基作为衔接蛋白,可识别 APC / C 的催化底物并与之结合,使底物泛素化。SIRT2 使 CDH1 和 CDC20 脱乙酰基并增强其与 APC / C 的结合,进而增加 APC / C 活性,调节有丝分裂的进行<sup>[26]</sup>。SIRT2 缺乏可导致与 Aurora-A 表达增加相关的中心体扩增和染色体不稳定增加并促使肿瘤发生<sup>[25]</sup>。

#### 4 结语

随着对 Sirtuins 蛋白家族研究的深入,其功能涉及维持基因组稳态中的多种细胞过程,更多的酶活性和调控机制被发现。不仅直接参与 DNA 损伤位点相关修复蛋白的募集和表观遗传学的调控,还可通过影响细胞能量代谢调控环境压力对基因组的影响。但这其中仍存在许多问题待进一步探讨,1、既往研究认为 Sirtuins 蛋白在 DNA 修复过程中只涉及同源修复方式,而近期有研究表明 SIRT1 和 SIRT7 可能参与提高非同源末端连接修复途径的效率的调节,表明 Sirtuins 蛋白在两种 DSBs 修复途径中的作用可能有待进一步明确,它们可能参与了 DNA 损伤时细胞对损伤修复通路的选择。2、在损伤部位可同时募集几种 Sirtuins 成员,其中是否存在相互协同,同样作为组蛋白去乙酰化酶,具有共同的靶标,在对染色质动力学的调节方面是否存在协同配合或拮抗关系。3、近年来在肿瘤研究中发现 Sirtuins 蛋白在肿瘤的发生、癌症转移中起着重要作用,而基因组不稳定也是肿瘤发生发展的重要起因, Sirtuins 蛋

白在调控基因组稳定性并进一步促进肿瘤发生发展的具体机制和功能仍待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited[J]. *Genes Dev.* 2013, 27(19): 2072-2085.
- [2] Jang J, Huh Y J, Cho H J, et al. SIRT1 Enhances the Survival of Human Embryonic Stem Cells by Promoting DNA Repair[J]. *Stem Cell Reports.* 2017, 9(2): 629-641.
- [3] Wang G, Wang F, Ren J, et al. SIRT1 Involved in the Regulation of Alternative Splicing Affects the DNA Damage Response in Neural Stem Cells[J]. *Cell Physiol Biochem.* 2018, 48(2): 657-669.
- [4] Utani K, Aladjem M I. Extra View: Sirt1 Acts As A Gatekeeper Of Replication Initiation To Preserve Genomic Stability[J]. *Nucleus.* 2018, 9(1): 261-267.
- [5] Ong A, Ramasamy T S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming[J]. *Ageing Res Rev.* 2018, 43: 64-80.
- [6] Ghosh D, Bohr V A, Karmakar P. Acetylation of Werner protein at K1127 and K1117 is important for nuclear trafficking and DNA repair[J]. *DNA Repair (Amst).* 2019, 79: 22-31.
- [7] Lin Y H, Yuan J, Pei H, et al. KAP1 Deacetylation by SIRT1 Promotes Non-Homologous End-Joining Repair[J]. *PLoS One.* 2015, 10(4): e123935.
- [8] Utani K, Fu H, Jang S M, et al. Phosphorylated SIRT1 associates with replication origins to prevent excess replication initiation and preserve genomic stability[J]. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(13): 7807-7824.
- [9] Yasuda T, Kagawa W, Ogi T, et al. Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites[J]. *PLoS Genet.* 2018, 14(3): e1007277.
- [10] Zhang H, Park S H, Pantazides B G, et al. SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110(33): 13546-13551.
- [11] Onn L, Portillo M, Ilic S, et al. SIRT6 is a DNA double-strand break sensor[J]. *Elife.* 2020, 9.
- [12] Atsumi Y, Minakawa Y, Ono M, et al. ATM and

- SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient gammaH2AX Foci Formation[J]. *Cell Rep.* 2015, 13(12): 2728-2740.
- [13] Mao Z, Hine C, Tian X, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1[J]. *Science.* 2011, 332(6036): 1443-1446.
- [14] Hou T, Cao Z, Zhang J, et al. SIRT6 coordinates with CHD4 to promote chromatin relaxation and DNA repair[J]. *Nucleic Acids Res.* 2020.
- [15] Tang M, Li Z, Zhang C, et al. SIRT7-mediated ATM deacetylation is essential for its deactivation and DNA damage repair[J]. *Sci Adv.* 2019, 5(3): v1118.
- [16] Song C, Hotz-Wagenblatt A, Voit R, et al. SIRT7 and the DEAD-box helicase DDX21 cooperate to resolve genomic R loops and safeguard genome stability[J]. *Genes Dev.* 2017, 31(13): 1370-1381.
- [17] Rifai K, Judes G, Idrissou M, et al. SIRT1-dependent epigenetic regulation of H3 and H4 histone acetylation in human breast cancer[J]. *Oncotarget.* 2018, 9(55): 30661-30678.
- [18] Serrano L, Martinez-Redondo P, Marazuela-Duque A, et al. The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation[J]. *Genes Dev.* 2013, 27(6): 639-653.
- [19] Michishita E, Mccord R A, Berber E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin[J]. *Nature.* 2008, 452(7186): 492-496.
- [20] Tasselli L, Xi Y, Zheng W, et al. SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence[J]. *Nat Struct Mol Biol.* 2016, 23(5): 434-440.
- [21] Li L, Shi L, Yang S, et al. SIRT7 is a histone desuccinylase that functionally links to chromatin compaction and genome stability[J]. *Nat Commun.* 2016, 7: 12235.
- [22] Bao X, Liu Z, Zhang W, et al. Glutarylation of Histone H4 Lysine 91 Regulates Chromatin Dynamics[J]. *Mol Cell.* 2019, 76(4): 660-675.
- [23] Zhao G, Cheng Y, Gui P, et al. Dynamic acetylation of the kinetochore-associated protein HEC1 ensures accurate microtubule-kinetochore attachment[J]. *J Biol Chem.* 2019, 294(2): 576-592.
- [24] Ling H, Peng L, Wang J, et al. Histone Deacetylase SIRT1 Targets Plk2 to Regulate Centriole Duplication[J]. *Cell Rep.* 2018, 25(10): 2851-2865.
- [25] Kim H S, Vassilopoulos A, Wang R H, et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity[J]. *Cancer Cell.* 2011, 20(4): 487-499.

收稿日期: 2020年3月26日

出刊日期: 2020年5月8日

引用本文: 陈思齐, 胡焯, 谢妮. Sirtuins 家族维持基因组稳定性的研究进展[J]. *国际肿瘤前沿杂志*, 2020, 1(1): 1-5.

DOI: 10.12208/j.ijcan.20200001

检索信息: 中国知网、万方数据、Google Scholar

版权声明: ©2020 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS